



# 家族性パーキンソン病 PARK17原因遺伝子VPS35機能障害に伴う シヌクレイン 蓄積および神経毒性発現機序の解明

著者	三浦 永美子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16275号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/61109">http://hdl.handle.net/10097/61109</a>

## 学 位 論 文 要 約

博士論文題目 家族性パーキンソン病 PARK17 原因遺伝子 VPS35 機能障害に伴う  
 $\alpha$  シヌクレイン蓄積および神経毒性発現機序の解明

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻

神経・感覚器病態学 講座 神経内科学 分野

氏名 三浦 永美子

パーキンソン病 (PD) は中脳黒質ドパミン神経細胞脱落と神経細胞内封入体 (Lewy body, LB) 出現を特徴とする神経変性疾患である。 $\alpha$  シヌクレイン (aSYN) は LB の主要構成成分であるが、その形成機序や神経変性過程への影響については不明な点が多い。近年、PD 発病の病態機序の一つとして細胞内小胞輸送系の関与が注目されており、家族性 PD の PARK17 原因遺伝子として小胞輸送タンパクをコードする *vacuolar protein sorting 35* (*VPS35*) 遺伝子の D620N ミスセンス変異が同定されている。*VPS35* はエンドソームからトランスゴルジネットワークへ向けて積荷タンパク輸送を仲介するレトロマーの主要構成因子であり、aSYN 分解を担う代表的なリソソーム酵素であるカテプシン D (CTSD) の細胞内輸送・成熟過程に重要な役割を担っている。本研究では、*VPS35* 遺伝子異常に起因するレトロマー機能破綻が aSYN 代謝や神経変性、さらには PD 発症に至る機序を明らかにするべく、培養細胞ならびにショウジョウバエモデルを用いて以下の生化学的解析を行った。

(i) HEK293 細胞および HA-aSYN 安定発現 HEK293 細胞に対して RNAi 法を用いた *VPS35* 遺伝子サイレンシングを行い、免疫染色法およびウェスタンブロット法において *VPS35* ノックダウンに伴うレトロマー機能への影響、ならびに CTSD 成熟過程・aSYN 蓄積について検証した。(ii) 細胞分画法により *VPS35* ノックダウンによる細胞内 aSYN 蓄積量と局在変化を確認した。さらに、(iii) 神経特異的 (*elav*) あるいは複眼特異的 (*GMR*) プロモーター下にヒト野生型 (wt) aSYN 発現トランスジェニック (Tg) ハエと *dVPS35* (*drosophila melanogaster* *VPS35*) RNAi ハエを交配し、*dVPS35* 欠損ヒト aSYN Tg ハエを作製した。ウェスタンブロット法および免疫組織染色法によりハエ脳内 aSYN 蓄積量を評価し、(iv) 走査型電子顕微鏡を用いた複眼形態解析とクライミングアッセイ法を用いた運動機能評価にて表現型解析を行った。その結果、培養細胞における内在性 *VPS35* サイレンシングにてレトロマー障害を反映するマンノース 6-リン酸受容体 (CI-MPR) の発現低下とともに、CTSD の成熟障害ならびにリソソーム内への aSYN 蓄積が誘導された。また、ヒト wt aSYN Tg ハエにおける内在性 *dVPS35* サイレンシングにより、ハエ脳内にて界面活性剤不溶性 aSYN 蓄積とともにキノコ体神経細胞内における aSYN 陽性凝集体数の増加が観察された。同ハエでは複眼変性に加え加齢に伴う運動機能低下も認められた。これらの結果から、レトロマー機構は、CTSD プロセッシング・活性化の制御を介し、細胞内特にリソソームにおける aSYN 代謝・神経変性過程に寄与している可能性があるかと推定された。